

## ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA FORMATION DE GLYCÉRIDES PARTIELS AU COURS DE L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DES TRIGLYCÉRIDES

par

P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER

*Laboratoire de Chimie Biologique et des Corps Gras, Faculté des Sciences, Marseille (France)*

Le déroulement exact *in vivo* et *in vitro* de l'hydrolyse lipasique des graisses n'est pas encore connu avec certitude quoiqu'il représente un processus digestif fondamental. Plusieurs faits principaux semblent en être responsables:

a. L'échec subi par WILLSTÄTTER et ses élèves dans la purification des lipases.

b. L'emploi trop fréquent, dans les travaux *in vitro*, de tributyrine et de butyrate d'éthyle qui se différencient profondément des substrats lipasiques naturels (glycérides à longues chaînes grasses).

c. La méconnaissance de la structure glycéridique réelle des corps gras naturels. Cette structure est maintenant en voie d'élucidation grâce aux beaux travaux de HILDITCH et de son école.

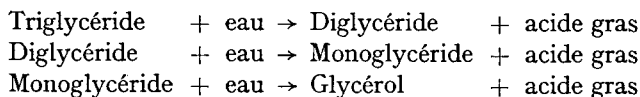
d. Le manque de moyens analytiques, enfin, qui, limitant les investigations aux acides gras libérés, n'a pas permis de suivre la nature de la phase glycéridique pendant l'hydrolyse fermentaire.

Malgré cette carence sur le plan enzymatique, deux hypothèses ont été présentées concernant la forme sous laquelle les graisses quittent la lumière intestinale au terme de leur digestion:

1. L'hypothèse lipolytique<sup>1</sup> d'après laquelle le glycérol et les acides gras seraient résorbés séparément. Il faudrait alors admettre que l'hydrolyse lipasique est totale, c'est-à-dire qu'elle transforme chaque molécule de triglycéride en une molécule de glycérol et trois molécules d'acides gras.

2. L'hypothèse de partage selon FRAZER<sup>2</sup>, d'après laquelle les graisses elles-mêmes seraient résorbées sous forme d'une émulsion très fine du type huile dans eau, dont la stabilité et la charge seraient assurées par un système ternaire: sels biliaires, acides gras et monoglycérides. FRAZER est donc conduit à penser que l'hydrolyse lipasique est incomplète puisqu'elle doit fournir des glycérides partiels au système émulsif précédent.

Notons ici que l'hydrolyse simultanée des trois chaînes grasses d'un triglycéride est très peu probable sur le plan biochimique comme sur le plan chimique. Il y a donc lieu a priori de prévoir trois stades successifs dans l'action lipasique:



Mais deux cas peuvent se présenter: Ou les glycérides partiels intermédiaires

s'hydrolysent plus vite que les triglycérides. Tout se passe alors comme si ces triglycérides étaient transformés directement en glycérol et en acides gras, ce qui est en bon accord avec l'hypothèse lipolytique. Ou les glycérides partiels s'hydrolysent moins vite que les triglycérides. Ils s'accumulent alors dans le milieu et peuvent y jouer le rôle que leur assigne l'hypothèse de FRAZER.

On s'accorde généralement à reconnaître que la lipase pancréatique *in vitro* ne libère pas toutes les chaînes grasses de son substrat triglycéridique. Ce fait pourrait paraître en faveur de l'hypothèse de FRAZER. Il n'en est rien toutefois car les chaînes grasses qui restent combinées en fin d'hydrolyse peuvent appartenir tout aussi bien à des triglycérides qu'à des glycérides partiels. Dans la première alternative, il convient alors de se demander si l'arrêt de la lipolyse n'est pas dû aux conditions mêmes de l'essai *in vitro*, par exemple, à l'accumulation des acides gras dans le milieu. L'hypothèse lipolytique, qui prévoit l'élimination continue de ces acides au cours du processus intestinal normal, conserve alors tous ses droits.

Il est donc nécessaire de rechercher directement, par des expériences *in vivo* et *in vitro*, si les lipases et, plus particulièrement, la lipase pancréatique donnent ou non naissance à des glycérides partiels. Un premier essai dans ce sens a été récemment réalisé par FRAZER<sup>3</sup>. Cet auteur fait agir, à 37° et à  $p_H = 7$ , de la pancréatine commerciale sur de l'huile d'olive en présence de sels biliaires. Après des temps variables, il détermine le glycérol dans les produits hydrosolubles et, dans les produits éthérosolubles, les acides gras et les fonctions -OH libres. Au bout de 4 h par exemple, il trouve que 32% des acides ont été libérés, mais qu'aucune trace de glycérol ne peut être décelée quoique ce trialcool ne soit pas attaqué par la préparation fermentaire. La fraction glycéridique, par contre, possède un indice d'acétyl tout-à-fait notable (60.8) et son traitement avec de l'anhydride phtalique donne naissance à des produits de condensation analogues, selon des conditions qui ne sont d'ailleurs pas précisées, soit à un monophthalate de diglycéride, soit à un diphtalate de monoglycéride. Les grandes lignes du phénomène ne sont pas sensiblement modifiées quand on fait varier le  $p_H$  (6.0-10.5), la quantité de pancréatine mise en jeu et la concentration des sels biliaires. De plus, des rats sont sacrifiés quelques heures après avoir ingéré de l'huile d'olive. Les glycérides trouvés dans leur intestin possèdent un indice d'acétyl égal à 70.

Ces résultats, dans leur ensemble, rendent évidemment probable la formation de glycérides partiels au cours de l'hydrolyse fermentaire des triglycérides. Il nous a paru intéressant, dans le présent travail, de les vérifier et de les préciser.

De les *vérifier* tout d'abord, car il ne faut pas oublier que BALLS et ses collaborateurs<sup>4</sup>, travaillant, il est vrai, dans des conditions tout-à-fait spéciales, sont arrivés à des conclusions diamétralement opposées à celles de FRAZER. Ils indiquent en effet qu'en faisant agir, à  $p_H$  8.0-8.4, à 40° et en présence d'ions calcium, un extrait glycérolé de pancréas sur des triglycérides mis préalablement en émulsion dans un mélange de glycérol et de bile, la lipolyse est pratiquement totale après 3 h. Interrompant, d'autre part, l'hydrolyse de la tristéarine au  $\frac{1}{3}$  et aux  $\frac{2}{3}$  de sa course, ils trouvent que la fraction glycéridique contient peu ou point de fonctions -OH libres et ils peuvent, par cristallisation, en isoler de la tristéarine pure avec un excellent rendement. De plus, la méthode utilisée par FRAZER pour séparer les produits d'hydrolyse en fractions hydro- et éthérosolubles nous a semblé susceptible d'entraîner quelques erreurs.

De les *préciser* ensuite, car on sait maintenant doser directement les  $\alpha$  monoglycérides par oxydation periodique. Cette technique nouvelle permet, comme nous le

verrons tout-à-l'heure, de connaître la nature de la phase glycéridique à chaque instant de l'hydrolyse fermentaire.

### TECHNIQUES ANALYTIQUES

#### I. Séparation des fractions hydro- et éthérosolubles

Il convient, avant toute chose, de séparer les produits d'hydrolyse lipasique en fraction hydro-soluble (glycérol) et fraction éthérosoluble (acides, gras, glycérides). Cette séparation doit être réalisée avec grand soin. Il faut en effet tout d'abord qu'elle soit complète car des traces de glycérol dans la fraction éthérosoluble peuvent laisser croire faussement à la présence de glycérides partiels. Il faut aussi qu'elle évite les pertes de glycérol par évaporation et les remaniements dans la structure de la phase glycéridique. Ces remaniements sont d'autant plus à redouter que l'hydrolyse fermentaire donne naissance, comme nous le verrons plus loin, à des  $\beta$  monoglycérides particulièrement instables. Il faut enfin qu'elle débarrasse totalement les produits gras de l'acide ayant servi à l'inactivation du ferment.

Après avoir coagulé les protéines, FRAZER<sup>3</sup> évapore le milieu d'hydrolyse à sec et reprend le résidu d'abord à l'éther puis à l'eau.

Il semble bien qu'une telle technique ne satisfasse pas à toutes les conditions précédentes. Ayant soumis en effet aux divers traitements indiqués par l'auteur, des liquides contenant, respectivement, 3.7 et 27.5 mg de glycérol, nous n'en avons retrouvé dans la phase aqueuse que 0.5 et 18.5 mg. Au cours de la deuxième expérience, de plus, la phase étherée en contient 2.6 mg. Il nous a donc paru plus rationnel d'opérer comme suit:

Le milieu d'hydrolyse lipasique est acidifié par 1.3 ml d'acide acétique glacial, puis il est versé dans 65 ml d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther. On fait bouillir pour coaguler les protéines, décante et lave le coagulum deux fois avec 10 ml du mélange alcool-éther. Les divers liquides, une fois réunis, sont concentrés sous vide à 10 ml (temp. < 50°). On transfère quantitativement la solution restante dans un décanteur en s'aidant de 40 ml d'éther. On sépare la phase aqueuse et lave 3 fois la phase étherée avec 10 ml d'eau. Les eaux sont traitées 2 fois avec 10 ml d'éther et, après un court passage sous vide, elles sont filtrées dans un ballon jaugé. Le coagulum protéique, d'autre part, est épuisé à l'eau chaude et cette nouvelle solution est introduite dans le ballon jaugé précédent. On porte enfin à un volume connu (Fraction hydrosoluble). La phase étherée, de son côté, est évaporée au bain marie. On ajoute au résidu 10 ml d'eau que l'on chasse partiellement sous vide (Temp. < 50°) afin d'éliminer l'acide acétique. On prend grand soin à ce moment d'éviter tout chauffage prolongé qui provoquerait des isomérisations. On recommence une fois encore puis on déshydrate par traitements successifs à l'alcool et à l'éther. On dissout enfin le résidu dans l'éther et porte à un volume connu (Fraction éthérosoluble).

Cette technique, appliquée à un mélange connu, nous a donné des résultats satisfaisants (Tableau I).

TABLEAU I

	Mis en jeu (mg)	Retrouvé (mg)
<i>Phase hydrosoluble</i>		
Glycérol . . . . .	25.7	25.6
<i>Phase éthérosoluble</i>		
Poids total . . . . .	1214	1183
Acide oléique . . . .	242.8	241.8
Monostéarine . . . .	144.6	131.3
Distéarine . . . . .	102.2	114.8
Triglycérides . . . .	724.4	695.1

Les chiffres du Tableau I mettent aussi en évidence la validité des techniques analytiques qui vont maintenant être discutées.

## 2. Dosage des $\alpha$ monoglycérides

Les monoglycérides, possédant 2 fonctions  $-OH$  contiguës, sont soumis à l'oxydation périodique. Basées sur ce principe simple, plusieurs techniques de dosage ont récemment été proposées<sup>5, 6</sup>. Elles se différencient essentiellement par la nature du solvant utilisé. Notre préférence est allée au mélange acide acétique-chloroforme<sup>6</sup> qui permet d'opérer en milieu homogène. Nous nous sommes efforcés de réduire considérablement les quantités de monoglycérides nécessaires au dosage et nous avons finalement adopté la technique suivante:

On pèse dans un petit récipient rodé une prise d'essai contenant au maximum 0.04 millimol d' $\alpha$  monoglycérides. On ajoute 1.5 ml d'un mélange à 1 partie d'acide acétique glacial et 2 parties de chloroforme puis 4 ml de réactif periodique\*. Après avoir agité afin d'obtenir une solution homogène, on rince le bouchon avec 2 ml d'acide acétique et on laisse réagir à température ordinaire pendant 15 min. On verse le contenu du tube dans un petit erlenmeyer et on rince le tube 4 fois avec 1 ml d'acide acétique. On ajoute alors 3 ml de IK à 10% et, avec une pipette de précision, 5 ml de thiosulfate 0.09 N. Le dosage iodométrique est ensuite terminé à la microburette avec ce même thiosulfate. On mène parallèlement un essai à blanc.

## 3. Dosage des acides gras libres

Un poids connu de la fraction éthersoluble est dissout dans 5 ml d'un solvant ternaire<sup>7</sup> composé de 2 parties de chloroforme anhydre, 1 partie d'éther anhydre et 1 partie d'alcool à 96%. L'acidité est dosée en présence de phénolphthaléine en ajoutant à la microburette de la potasse alcoolique 0.02 N fraîchement préparée. Du résultat obtenu, on déduit un essai à blanc effectué sur 5 ml de solvant.

## 4. Dosage du glycérol

Ce trialcool a été déterminé dans la fraction hydrosoluble grâce à une technique colorimétrique déjà décrite en détail par nous<sup>8</sup>. Nous avons vérifié que tous les ions minéraux dont nous pouvions suspecter la présence dans nos solutions n'exercent aucune influence sensible sur le développement de la coloration.

## 5. Dosage des fonctions $-OH$ éthersolubles

Guidés par le même souci que précédemment, nous avons cherché à modifier la technique classique de l'indice d'hydroxyle afin de réduire, dans toute la mesure du possible, le poids de la prise d'essai. Après de nombreux efforts, nous avons adopté le mode opératoire suivant:

Un poids connu de la fraction éthersoluble, contenant 0.5–2.0 milli  $-OH$ , est placé dans un ballon rodé de 150 ml. On ajoute 2 ml du réactif acylant (6.25 g d'anhydride acétique pur amenés à 25 ml par de la pyridine anhydre). On humecte le rodage du ballon avec un peu de pyridine et on lui adapte une canne formant réfrigérant. On porte alors à 100–105° au bain de glycérine pendant 1 h. Après refroidissement, on ajoute, par le haut de la canne, 1 ml d'eau et 5 ml de pyridine. On chauffe de nouveau à 100–105° pendant 20 min, puis on rince soigneusement la canne et le rodage avec 5 ml d'alcool neutre à 96%. On refroidit encore une fois longuement sous le robinet et on ajoute à

\* Ce réactif est préparé en dissolvant 500 mg de métaperiodate de Na dans 20 ml d'eau et en étendant à 100 ml avec de l'acide acétique.

la pipette, lentement et en agitant bien, 25 ml de potasse alcoolique 0.4 N. On amène enfin à coloration rose persistante de la phénolphthaleïne, en introduisant dans le milieu de la potasse alcoolique 0.1 N. Un dosage à blanc est conduit simultanément dans les mêmes conditions.

#### 6. Séparation de la monooléine par dissolution sélective

Au cours de notre travail, nous avons dû chercher à séparer la monooléine des autres glycérides oléiques. La solubilité de la monooléine dans l'alcool, commune à tous les monoglycérides, nous a semblé devoir être utilisée. Mais, afin d'accroître la sélectivité du traitement, nous avons réparti sur du sable le mélange glycéridique en une couche extrêmement mince et nous avons fait percoler à travers ce sable des alcools de titre convenable. L'opération est conduite comme suit:

125 g de sable de Fontainebleau, soigneusement lavé à l'eau chaude puis à l'alcool et dégraissé au Soxhlet, sont placés dans une capsule. On dissout d'autre part 500 mg de mélange gras dans une quantité d'éther juste suffisante pour recouvrir complètement le sable et on verse cette solution dans la capsule. On chauffe au B.M. électrique en agitant bien la masse et, quand toute odeur d'éther a disparu, on vide le sable dans une grosse colonne à chromatographie en prenant soin qu'il ne se forme pas de cheminées. On fait ensuite percoler à travers la colonne de l'alcool à 60% jusqu'à ce que 200 ml du liquide aient été recueillis. On ramène le titre de l'alcool à 40% par addition d'eau et on extrait 4 fois la liqueur avec 75 ml d'éther de pétrole léger. L'extrait est évaporé à une température inférieure à 50° et le résidu est dissout dans l'éther. Ce nouvel extrait est séché à poids constant dans un ballon taré. Un essai à blanc, dans lequel sont utilisées les mêmes quantités de solvant et de sable, est effectué simultanément.

Voici un exemple des résultats données par cette technique, quand elle est appliquée à un mélange d'interstérification trioléine-glycérol<sup>9</sup> additionné d'acide oléique et de trioléine pure<sup>10</sup>. Rappelons que l'interstérification chimique ne donne naissance qu'à des  $\alpha$  monoglycérides directement dosables par oxydation périodique.

TABLEAU II  
SÉPARATION DE LA MONOOLÉINE DES AUTRES GLYCÉRIDES OLÉIQUES

	Mis en jeu (mg)	Retrouvé dans le liquide de percolation (mg)
Masse totale . . . . .	549.0	167.9*
$\alpha$ Monooléine . . . . .	66.4	59.8
Acide oléique . . . . .	174.7	108.0
Autres glycérides oléiques	307.9	néant

\* De ce chiffre sont retranchés 6 mg représentant le poids de substances entraînées au cours de la percolation de 125 g de sable par 200 ml d'alcool à 60%.

On voit donc que le liquide de percolation contient 90% environ de l' $\alpha$  monooléine initialement présente. Cette  $\alpha$  monooléine est complètement débarrassée de la di- et de la trioléine qui l'accompagnaient au départ.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

##### 1. Sur la formation d' $\alpha$ et de $\beta$ monoglycérides

Des essais préliminaires, au cours desquels nous avons oxydé par le periodate la fraction éthersoluble de nos hydrolysats, nous ont vite convaincu que la lipase pancréatique, dans nos conditions

*Bibliographie p. 574.*

expérimentales tout-au-moins, forme bien des monoglycérides<sup>11</sup>. Toutefois, la technique de l'oxydation périodique permet seulement, nous l'avons vu, de déterminer les monoglycérides de structure  $\alpha$  et non leur totalité. Le fait est de peu d'importance en chimie organique car, quand on prépare des glycérides partiels au Laboratoire, en interestérifiant par exemple des mélanges triglycérides-glycérol<sup>9</sup>, on obtient exclusivement ces isomères  $\alpha$ . S'il en était de même au cours de l'hydrolyse lipasique, l'analyse de la fraction glycéridique s'effectuerait aisément.

Supposons en effet que nous mettions en jeu, au début d'un essai,  $T$  mol de triglycérides. Soit  $t$  le nombre de mol de triglycérides restant à la fin de l'expérience, et, respectivement,  $d$ ,  $m$  et  $g$  le nombre de mol de diglycérides, monoglycérides et glycérol formées. Nous pouvons évidemment écrire :

$$T = t + d + m + g \quad (1)$$

$g$  est déterminé par oxydation périodique de la phase aqueuse. Quant à  $m$ , étant donné qu'il ne représente que des  $\alpha$  monoglycérides, il est trouvé par oxydation périodique de la phase étherée. L'inconnue  $d$  peut alors être calculée en faisant intervenir le nombre de fonction OH éthersolubles ( $-OH$ ) :

$$(-OH) = 2m + d \quad (2)$$

et la dernière inconnue  $t$  est déduite de l'équation (1).

Toutefois, la température élevée à laquelle est conduite l'interestérification chimique semble seule responsable de la formation exclusive des isomères  $\alpha$  et nous n'avons aucune raison de supposer à priori que les lipases, agissant à  $37^\circ$ , ne forment pas d'isomères  $\beta$ . La grandeur  $m$  se décompose alors en deux éléments  $ma$  et  $m\beta$  dont le premier seul est susceptible d'être déterminé directement.

Notons ici qu'une hypothèse simple peut être faite concernant la valeur du rapport  $ma/m\beta$ . Elle consiste à supposer que l'action lipasique ne dépend pas de la position des chaînes grasses dans les molécules triglycéridiques. Il devient alors évident que la trioléine, par exemple, donnera naissance à une molécule de  $\beta$  monooléine pour deux molécules d' $\alpha$ . C'est cette hypothèse que nous avons cherché à vérifier expérimentalement en séparant par notre méthode de dissolution sélective la monooléine totale produite par lipolyse.

1.2 g de trioléine de synthèse<sup>10</sup> sont placés dans un tube rodé avec 6.5 ml de tampon phosphate M/10 à  $p_H = 7.0$ , 7.8 mg de pancréatine "Byla" en suspension dans 1.3 ml d'eau et 0.15 ml d'une solution à 10% de sels biliaires (HOFFMAN-LA ROCHE). Le tube est porté dans un thermostat à  $37^\circ$ . Pendant la première heure, il est agité fréquemment afin de maintenir l'émulsification. Après 18 h de contact, la lipolyse est arrêtée par addition de 1.3 ml d'acide acétique glacial. La fraction éthersoluble est séparée. 455 mg de cette fraction sont répartis sur sable et les monoglycérides qu'ils contiennent sont dissous dans l'alcool à 60% comme il est dit plus haut. Une expérience identique est réalisée sur un même poids de trioléine mais, dès le départ, le ferment est inactivé par addition d'acide acétique.

Les résultats de ces essais sont donnés dans le Tableau III.

Les chiffres du Tableau III montrent que les liquides de percolation obtenus après lipolyse contiennent, à côté d'acide oléique et d' $\alpha$  monooléine, 23 mg environ d'autres produits. De ces 23 mg, il convient de retrancher 12 mg environ représentant le "blanc" de la colonne et des réactifs. La lipolyse a donc donné naissance à 11 mg de substances solubles dans l'alcool que l'interestérification chimique ne forme pas (voir Tableau II). Comme, d'autre part, ces substances ne peuvent être ni de l'acide oléique ni de l' $\alpha$  monooléine ni enfin de la dioléine, il semble logique de penser que la  $\beta$  monooléine en représente la plus grande part. Remarquons alors que le poids trouvé (11 mg) est à peu près la moitié de celui de l' $\alpha$  monooléine dosée (20 mg). Nous considérons donc que, dans nos expériences précédentes, la lipase pancréatique a fait apparaître une molécule de  $\beta$  monooléine pour deux molécules d' $\alpha$ .

TABLEAU III

SÉPARATION, PAR DISSOLUTION SÉLECTIVE, DE LA MONOOLÉINE FORMÉE AU COURS DE LA LIPOLYSE DE LA TRIOLÉINE

	Essai I		Essai II	
	Avant lipolyse	Après lipolyse	Avant lipolyse	Après lipolyse
Substance mise dans la colonne (mg). . . . .	455	449	473	484
<i>Contenant:</i>				
Acide oléique (mg) . . . . .	16.6	170	18.3	164
$\alpha$ monooléine (mg) . . . . .	5.3	30.6	5.3	28.8
Substance extraite par percolation de la colonne (mg)	23.2	146.3	23.1	185.0
<i>Contenant:</i>				
Acide oléique (mg) . . . . .	6.0	97.8	5.9	135.9
$\alpha$ monooléine (mg) . . . . .	5.3	25.2	5.2	25.7
Autres produits (mg) . . . . .	11.9	23.3	12.0	23.4
Excédent de poids attribuable à la $\beta$ monooléine (mg)	—	11.4	—	11.4
Poids d' $\alpha$ -monooléine formé par la lipolyse (mg) . . .	—	19.9	—	20.5

2. Etude de l'hydrolyse fermentaire de la trioléine. ( $p_H = 7.0$ . Pas de sels de Ca)

Ce résultat une fois atteint, il devient possible d'entreprendre l'analyse complète des milieux d'hydrolyse lipasique. Dans ce but, nous avons soumis, pendant des temps variables et dans les conditions expérimentales déjà décrites au paragraphe précédent, de la trioléine<sup>10</sup> à l'action de la pancréatine. Le  $p_H$  final est, dans tous les cas, égal à 6.9. Les fractions hydro- et éthérosolubles ont été séparées comme indiqué plus haut. Le nombre de molécules de monooléine totale a été pris égal à 1.5 fois celui que donne l'oxydation periodique ( $\alpha$  monooléine seulement).

Le Tableau IV, tout d'abord, dont les éléments sont portés sous forme graphique

TABLEAU IV

PROPORTIONS MOLAIRES DE TRIOLÉINE, DIOLÉINE, MONOOLÉINE TOTALE, GLYCÉROL ET ACIDE PENDANT L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DE LA TRIOLÉINE

Trioléine de synthèse. Pancréatine "Byla". Tampon phosphate à  $p_H = 7.0$ . Pas de sels de Ca.

Durée (h)	Acide oléique	Glycérol	Monooléine	Dioléine	Trioléine
0	0	0	0	0	100
2	18.1	2.2	6.9	35.9	54.9
4	25.6	3.7	9.5	47.3	39.6
6	29.1	5.2	10.9	51.4	32.5
18	34.7	9.1	20.6	37.9	32.3

dans la Fig. 1, indique les proportions molaires des divers composants trouvés dans les deux fractions. Pour plus de clarté, les proportions de chaque composant ont été calculées en prenant pour base 100 le nombre maximum de molécules susceptibles d'être formées à partir de 100 molécules des triglycérides initiaux. Le Tableau V met en évidence l'exactitude de nos diverses méthodes de dosage. Il est bien évident en effet que, si l'on suppose que le glycérol ne subit aucune dégradation ultérieure, le nombre de

chaînes grasses (3  $\Delta a$ ) apparues pendant un temps donné doit être égal au nombre de fonctions  $-OH$  hydro et éthersolubles formées. L'égalité suivante doit donc être satisfaite:

$$3 \Delta a = \Delta (-OH) + 3 \Delta g$$

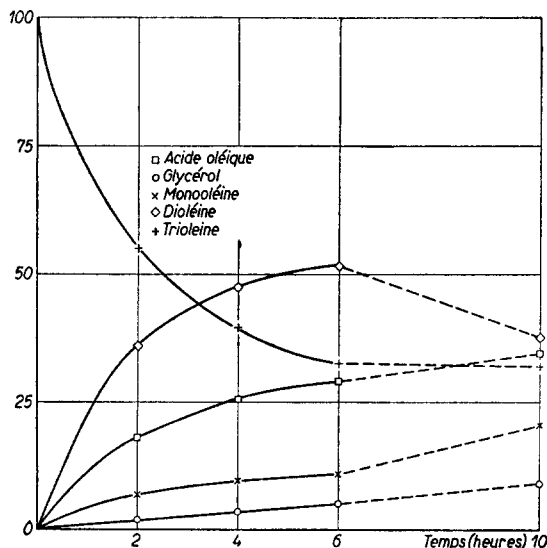


Fig. 1 Hydrolyse fermentaire de la trioléine à pH = 7 et en l'absence d'ions  $Ca^{++}$

Le Tableau VI, enfin, fait état, non plus des proportions molaires des différents composants, mais de leurs proportions pondérales.

TABLEAU V

COMPARAISON ENTRE LE NOMBRE DE CHAÎNES GRASSES LIBÉRÉES ET LE NOMBRE D'OH HYDRO- ET ÉTHÉROSOLUBLES FORMÉS

Intervalle de temps (heures)	Nb de chaînes grasses apparues (3 $\Delta a$ )	Nb de fonctions $-OH$ totales ( $\Delta(-OH) + 3 \Delta g$ )
0—2	54.3	56.3
2—4	22.5	21.1
4—6	10.5	11.4
6—18	16.4	18.6

TABLEAU VI

PROPORTIONS PONDÉRALES (%) DES DIVERS CONSTITUANTS GLYCÉRIDiques PENDANT L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DE LA TRIOLÉINE

Durée de l'hydrolyse (h)	Glycérol	Monooléine	Dioléine	Trioléine
2	0.3	3.3	30.4	66.0
4	0.5	5.2	41.9	52.4
6	0.7	6.0	49.1	44.2

### 3. Hydrolyse de certaines graisses naturelles par la pancréatine en l'absence d'ions $Ca^{++}$

Les expériences précédentes ont été réalisées sur de la trioléine pure, c'est-à-dire sur un substrat parfaitement défini. Les graisses naturelles alimentaires, toutefois,



renferment peu de glycérides homogènes, mais sont riches en glycérides mixtes. Il était donc intéressant d'étudier également le comportement de ces graisses naturelles vis-à-vis de la lipase pancréatique. Dans ce but, des échantillons d'huiles d'arachide, de tournesol et de coprah ont été traités par la technique de WESSON<sup>12</sup>, afin de les débarrasser de leurs impuretés non-glycéridiques et de leurs acides. Puis ils ont été mis au contact de pancréatine dans les mêmes conditions que précédemment (Tableau VII).

TABLEAU VII

PROPORTIONS MOLAIRES DE TRIGLYCÉRIDES, DIGLYCÉRIDES, MONOGLYCÉRIDES, GLYCÉROL ET ACIDES GRAS PENDANT L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DE CERTAINES GRAISSES NATURELLES

Pancréatine "Byla" ou "B.D.H.".  $P_H = 7.0$ . Pas de sels de Ca.

Durée de l'hydrolyse (h)	Acides gras	Glycérol	Monoglycérides	Diglycérides	Triglycérides
Substrat: Arachide. Pancréatine "Byla"					
0	0	0	0	0	100
2	22.0	1.0	8.6	43.3	47.1
4	28.9	2.8	11.3	51.0	34.9
6	32.6	4.6	12.3	53.6	29.5
18	42.5	13.8	29.5	38.3	18.4
Substrat: Arachide. Pancréatine "B.D.H."					
0	0	0	0	0	100
2	24.9	1.0	10.0	50.0	37.7
4	30.3	1.75	13.7	57.3	27.1
6	33.6	3.2	16.1	59.8	21.3
18	44.5	13.1	28.6	36.2	20.1
Substrat: Tournesol. Pancréatine "Byla"					
0	0	0	0	0	100
2	16.3	0.7	2.4	44.9	52.0
4	27.8	2.9	9.0	47.0	40.4
6	30.7	4.2	13.1	47.8	34.8
18	39.0	8.0	27.0	37.9	27.1
Substrat: Coprah. Pancréatine "Byla"					
0	0	0	0	0	100
2	20.8	0.75	0.6	58.5	40.1
4	28.0	1.8	3.4	72.3	22.5
6	33.9	3.3	5.0	78.5	13.2
18	41.3	8.1	13.5	71.8	6.6

Nous avons, dans ce cas encore, calculé la quantité totale de monoglycérides formés en multipliant par 1,5 la quantité d' $\alpha$  monoglycérides dosés. Cette manière de faire n'est sans doute plus aussi légitime que dans nos expériences avec la trioléine. Nous avons en effet vérifié que la lipase pancréatique ne possède pas de spécificité de position dans le cas seulement où les carbones  $\alpha$  et  $\beta$  du glycérol portent la même chaîne grasse. Mais cette lipase arrache peut-être certains types de chaînes plus vite que d'autres. Il n'est pas sûr alors qu'il se forme exactement une molécule de  $\beta$  monoglycérides pour deux molécules d' $\alpha$ . Toutefois, les résultats qui vont suivre sont tellement analogues à ceux obtenus sur la trioléine que les erreurs introduites de ce fait sont probablement négligeables.

#### 4. Influence du $p_H$ et des sels de Ca

Les expériences de FRAZER suggèrent que la lipase pancréatique forme des glycérides partiels à tous les  $p_H$  où elle est active. Nous avons voulu cependant savoir si les variations de  $p_H$  ne modifiaient pas la vitesse d'apparition et de disparition de ces glycérides.

Des expériences ont donc été réalisées dans une solution tampon de phosphate M/10 à  $p_H = 8.0$ . La réaction alcaline a été maintenue pendant toute la durée de l'essai par des additions successives de soude 2 N. (Tableau VIII).

TABLEAU VIII

PROPORTIONS MOLAIRES DES DIVERS CONSTITUANTS PENDANT L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DES GLYCÉRIDES DE L'ARACHIDE

A  $p_H = 8.0$  ET EN L'ABSENCE D'IONS  $Ca^{++}$

Durée de l'hydrolyse (h)	Acides gras	Glycérol	Monoglycérides	Diglycérides	Triglycérides
0	0	0	0	0	100
2	23.4	2.3	12.1	40.1	45.5
4	31.5	4.7	14.5	52.1	27.5
6	40.0	6.5	17.1	65.9	10.4

On sait depuis longtemps, d'autre part, que les sels de Ca favorisent dans une large mesure la mise en liberté des acides gras par la lipase. Ces sels doivent donc accélérer la dégradation des glycérides partiels. Peut-être même provoquent-ils leur disparition immédiate et sont-ils à l'origine des résultats obtenus par BALLS<sup>4</sup>. Nous avons donc réalisé une lipolyse en leur présence.

Une quantité d'ions  $Ca^{++}$  juste suffisante pour saturer toutes les chaînes grasses du substrat glycéridique a été ajoutée à nos milieux, sous forme de  $CaCl_2$ . La présence de ces ions interdit évidemment l'emploi du tampon phosphate. Aussi avons-nous utilisé un tampon  $NH_4Cl-NH_3$  M/10 à  $p_H = 8.0$ . Ce  $p_H$  a été maintenu pendant toute la durée de l'expérience grâce à des adjonctions répétées d'ammoniaque 4 M. Les acides gras libérés par l'hydrolyse n'ont pas été déterminés, comme d'habitude, dans la fraction éthérosoluble, mais bien par un simple dosage acidimétrique effectué sur une solution alcoolique du milieu réactionnel total<sup>4</sup>.

Les résultats sont donnés dans le Tableau IX et la Fig. 2.

Signalons ici qu'en présence de sels de Ca, la pancréatine fait disparaître le glycérol à une vitesse notable. Nous avons donc tracé, dans la Fig. 2, la courbe de ce trialcool légèrement au-dessus des points expérimentaux.

TABLEAU IX

PROPORTIONS MOLAIRES DES TRIGLYCÉRIDES, DIGLYCÉRIDES, MONOGLYCÉRIDES, GLYCÉROL ET ACIDES GRAS AU COURS DE L'HYDROLYSE FERMENTAIRE DES GLYCÉRIDES DE L'ARACHIDE A  $\text{pH} = 8.0$  ET EN PRÉSENCE DE SELS DE Ca

Pancréatine: "Byla". Tampon  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_3$  à  $\text{pH} = 8.0$

Durée de l'hydrolyse (h)	Acides gras	Glycérol	Monoglycérides	Diglycérides	Triglycérides
0	0	0	0	0	100
$\frac{1}{4}$	21.2	1.4	8.3	34.6	55.7
$\frac{1}{2}$	37.4	2.5	20.5	64.0	13.0
$\frac{3}{4}$	48.5	3.5	36.5	56.0	2.0
$1\frac{1}{2}$	66.0	5.8	81.9	7.8	1.5
$2\frac{1}{4}$	69.4	7.9	79.1	5.7	0.4
3	71.5	19.1	75.1	5.2	0.0

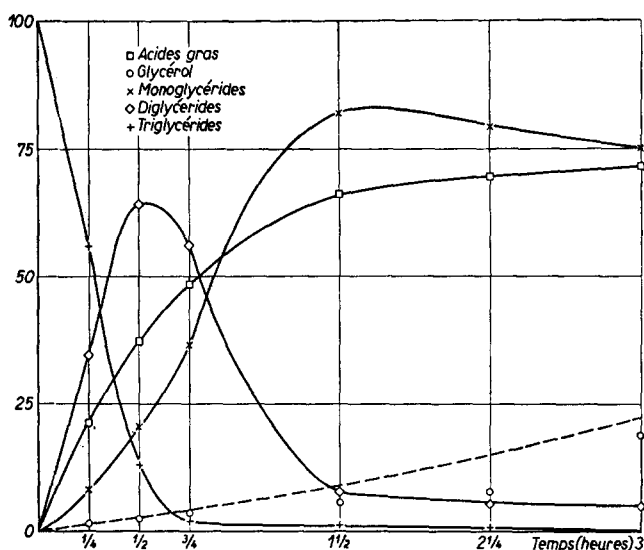


Fig. 2. Hydrolyse fermentaire des glycérides de l'arachide à  $\text{pH} = 8.0$  et en présence de sels de Ca.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les expériences qui viennent d'être décrites suggèrent dès maintenant quelques commentaires:

1. Nous confirmons dans leur ensemble les résultats obtenus par FRAZER *in vitro*. Si l'on met des triglycérides homogènes purs (trioléine) ou des mélanges complexes de glycérides mixtes (graisses naturelles purifiées) au contact d'une solution aqueuse tamponnée contenant des sels biliaires et de la pancréatine, il se forme des quantités très importantes de glycérides partiels. La lipase pancréatique arrache donc bien *succesivement* les trois chaînes grasses de son substrat. Des techniques analytiques satisfaisantes nous ont permis de suivre le déroulement exact de ces trois scissions hydrolytiques.

2. La première scission, correspondant au passage Triglycéride-Diglycéride, est toujours très rapide au début de l'expérience. Mais sa vitesse ne tarde pas à décroître

quand on opère à  $p_H = 7$  et en l'absence de sels de Ca. Une limite est alors atteinte et 10-30% des triglycérides initiaux échappent à l'hydrolyse. Les triglycérides du coprah, possédant des chaînes grasses courtes, semblent d'ailleurs disparaître plus complètement et plus vite que ceux des autres graisses.

Quand la lipolyse se déroule à  $p_H = 8.0$ , mais, surtout quand le milieu réactionnel contient des sels de Ca, l'hydrolyse des triglycérides arrive très rapidement à son terme. Les sels de Ca exercent un effet particulièrement frappant: c'est ainsi (cas de l'arachide) que la présence de 1 ion  $Ca^{++}$  par chaîne grasse libérable fait passer, au bout de  $\frac{3}{4}$  d'heure, le % de triglycérides non-hydrolysés de 70 à 2% environ.

3. Les diglycérides qui prennent naissance au cours de cette première scission se transforment eux-mêmes progressivement en monoglycérides par perte d'une deuxième chaîne grasse. La quantité de diglycérides que l'on trouve dans les milieux d'hydrolyse dépend évidemment de la vitesse relative des deux réactions:

Triglycérides  $\rightarrow$  Diglycérides et

Diglycérides  $\rightarrow$  Monoglycérides.

En l'absence de sels de Ca, les diglycérides s'hydrolysent lentement. Il va donc en apparaître beaucoup dès le début de la lipolyse tandis que la proportion de monoglycérides formés restera faible. C'est ainsi, par exemple, que le mélange glycéridique issu de l'hydrolyse pancréatique de la trioléine (2, 4 et 6 heures) contient, en poids, près de 10 fois plus de dioléine que de monooléine. Toutefois, les monoglycérides sont en quantité bien suffisante<sup>13</sup> pour jouer le rôle d'émulsifiant qui leur est demandé<sup>3</sup>.

Par contre, l'arrachement de la deuxième chaîne grasse est considérablement accéléré par les sels de Ca. Mais, même dans ce cas, la deuxième chaîne grasse n'est jamais hydrolysée aussi vite que la première. On peut donc distinguer 2 stades: Pendant la première demi-heure, la genèse des diglycérides est suffisamment intense pour l'emporter sur leur dégradation; puis, les triglycérides générateurs étant épuisés, les diglycérides disparaissent rapidement au profit des monoglycérides.

4. Les monoglycérides, à leur tour, subissent une lente hydrolyse. Contrairement à ce qu'indique FRAZER<sup>3</sup>, il apparaît toujours en effet un peu de glycérol dès le début de la réaction. Chose curieuse, les ions  $Ca^{++}$ , qui accélèrent beaucoup la dégradation des tri- et des diglycérides, ont peu d'action sur celle des monoglycérides. Ces derniers vont donc s'accumuler en quantités considérables (jusqu'à 82% en pds. de la phase glycéridique après 1 h  $\frac{1}{2}$  d'hydrolyse).

La non-formation de glycérides partiels dans les expériences de BALLS<sup>4</sup> ne peut donc être attribuée à la présence de sels de Ca.

5. Dans nos expériences comme dans celles de FRAZER, la libération des acides gras n'est jamais complète puisque l'hydrolyse s'arrête principalement, suivant le cas, au stade di- ou monoglycéride. Après une phase initiale pendant laquelle de grands bouleversements structuraux se produisent, la réaction fermentaire ralentit considérablement. Ce ralentissement ne peut pas être imputé à l'usure du ou des ferments mis en œuvre, puisque l'emploi de quantités plus importantes de pancréatine n'amène pas la lipolyse à son terme<sup>3</sup>. Il faut donc admettre soit que l'action lipasique est inhibée par les produits de la réaction, soit que les glycérides partiels sont, pour une raison ou pour une autre, mal hydrolysés par la lipase.

Notons ici, comme le rappelle très justement FRAZER<sup>14</sup> que l'hydrolyse des graisses doit obligatoirement se produire à une interface dont les dimensions et l'état sont de

grande importance pour le déroulement du phénomène. Au fur et à mesure que progresse la lipolyse, il faut s'attendre à ce que les chaînes grasses libres viennent s'accumuler à cette interface. Elles y forment alors une couche qui, selon FRAZER<sup>14</sup>, interdirait peu à peu au ferment l'accès de son substrat. C'est ainsi, par exemple, qu'une huile renfermant 30% d'acide oléique ne subit aucune hydrolyse dans les conditions expérimentales adoptées par l'auteur anglais.

Au cours de cette dernière expérience, toutefois, la phase grasseuse ne contient que des triglycérides apolaires et des acides gras, tandis que, dans le cas normal, elle renferme aussi des glycérides partiels. Ceux-ci (diglycérides et, surtout, monoglycérides) vont tendre également à venir à l'interface; on serait tenté de croire à priori que leur hydrolyse en soit facilitée et rendue, dans une certaine mesure, indépendante de la présence des acides gras libres. Or, c'est exactement le contraire que l'on observe dans les essais de FRAZER et les nôtres.

Parmi les nombreuses théories susceptibles de rendre compte de ce fait, signalons simplement la suivante: Les glycérides partiels sont orientés à l'interface de manière à plonger leur fonctions -OH dans l'eau. Peut-être ces fonctions agissent-elles comme une barrière interdisant aux liaisons ester situées en arrière d'elles, tout contact avec les grosses molécules fermentaires.

6. Nos expériences ne sont pas encore assez avancées pour nous permettre d'interpréter de façon satisfaisante l'action des sels de Ca sur l'hydrolyse des tri- et des diglycérides ainsi que la non-formation de glycérides partiels dans les essais de BALLS<sup>4</sup>. Jointes cependant aux observations de ce dernier auteur, elles suggèrent que l'action lipasique *in vitro* donne naissance à des produits bien différents selon les conditions adoptées. Le déroulement exact de l'hydrolyse des graisses *in vivo* ne peut donc être précisé que par l'analyse directe des glycérides qui se trouvent dans l'intestin pendant la résorption.

## RÉSUMÉ

Au cours du présent travail; nous faisons agir, dans diverses conditions expérimentales, deux pancréatines différentes sur un glycéride homogène pur (trioléine) ou des mélanges complexes de glycérides mixtes et homogènes (graisses naturelles purifiées).

Après avoir confirmé, par la technique à l'oxydation periodique, que la lipase pancréatique forme bien des quantités notables de monoglycérides, nous séparons la monooléine totale ayant pris naissance au cours de la lipolyse de la trioléine et nous y trouvons 1 mol de l'isomère  $\beta$  pour 2 mol d' $\alpha$ . Cette observation nous permet alors d'effectuer l'analyse complète des produits de lipolyse.

Nos expériences montrent qu'entre 1 et 4 h de contact:

a. à  $p_H = 7.0$  et en l'absence de sels de Ca, ces produits consistent en triglycérides non-attaqués et en diglycérides. On y trouve aussi un peu de monoglycérides et des traces de glycérol seulement.

b. à  $p_H = 8.0$ , les résultats sont analogues, quoiqu'on puisse observer une hydrolyse un peu plus complète des triglycérides.

c. à  $p_H = 8.0$  et en présence d'un ion de  $Ca^{++}$  par chaîne grasse libérable, par contre, les triglycérides et les diglycérides subissent une hydrolyse rapide et complète, tandis que les monoglycérides s'accumulent dans le milieu.

## SUMMARY

In the present work we have allowed two different pancreatins, under various experimental conditions, to act upon a pure homogeneous glyceride (triolein) or upon complex mixtures of mixed and homogeneous glycerides (natural purified fats).

After having confirmed by oxidation with periodate that pancreatic lipase actually produces appreciable quantities of monoglycerides, we have separated the total mono-olein arising during the lipolysis and shown that it consists of one molecule of the  $\beta$ -isomer to two molecules of the  $\alpha$ -

isomer. This observation has allowed us to carry out a complete analysis of the products of lipolysis.

Our experiments have shown that for 1-4 hrs contact:

a. at pH 7.0 and in the absence of Ca salts, these products consist of unattacked triglycerides and of diglycerides. There are also small amounts of monoglycerides and traces of glycerol.

b. at pH 8.0 the results are analogous, with a rather more complete hydrolysis of the triglycerides.

c. at pH 8.0 and in the presence of one ion of  $\text{Ca}^{++}$  per fatty chain that may be liberated, the triglycerides and diglycerides undergo on the contrary a rapid and complete hydrolysis, while the monoglycerides accumulate in the medium.

### ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe der vorliegenden Arbeit liessen wir unter verschiedenen experimentellen Umständen zwei verschiedene Pankreatinpräparate auf ein homogenes, reines Glyzerid (Triolein) oder auf komplexe Gemische von gemischten oder homogenen Glyceriden (gereinigte natürliche Fette) einwirken.

Nachdem wir mit Hilfe der Oxydation mit Perjodat bestätigt hatten, dass die Pankreaslipase wirklich bedeutende Mengen von Monoglyceriden bildet, trennten wir das gesamte Monoolein, das im Laufe der Lipolyse des Trioleins entstanden war, ab und fanden darin 1 Molekül des  $\beta$ -Isomers auf 2 Moleküle des  $\alpha$ -Isomers. Diese Beobachtung gestattete es uns dann, eine vollständige Analyse der Lipolyseprodukte durchzuführen.

Unsere Experimente zeigen, dass nach 1 bis 4 Stunden Kontakt:

a. bei pH 7.0 und bei Abwesenheit von Ca-salzen diese Produkte aus unangegriffenen Triglyceriden und aus Diglyceriden bestehen. Ausserdem findet man auch ein wenig Monoglyceride und Spuren von Glycerol.

b. bei pH 8.0, die Resultate analog sind, wobei man eine etwas weniger vollständige Hydrolyse der Triglyceride beobachten kann.

c. bei pH 8.0 und bei Anwesenheit eines  $\text{Ca}^{++}$ -Ions für jede Fettsäurekette, die freigesetzt werden kann, im Gegensatz zu den erstgenannten Beobachtungen, die Triglyceride und Diglyceride einer schnellen und vollständigen Hydrolyse unterworfen sind, während die Monoglyceride sich im Reaktionsmilieu anhäufen.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> F. VERZAR ET E. J. MACDOUGALL, *Absorption from the intestine*, Longmans, Green and Co., London, 1936.
- <sup>2</sup> A. C. FRAZER, *Analyst*, 63 (1938) 308.
- <sup>3</sup> A. C. FRAZER ET H. G. SAMMONS, *Biochem. J.*, 39 (1945) 122.
- <sup>4</sup> A. K. BALLS, M. B. MATLACK ET I. W. TUCKER, *J. Biol. Chem.*, 122 (1937) 125.
- <sup>5</sup> W. D. POHLE, V. C. MEHLENBACHER ET J. H. COOK, *Oil and Soap*, 22 (1945) 115.
- <sup>6</sup> E. HANDSCHUMAKER ET L. LINTERIS, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.*, 24 (1947) 143.
- <sup>7</sup> G. GORBACH, *Fette u. Seifen*, 47 (1940) 499.
- <sup>8</sup> P. DESNUELLE, S. ANTONIN ET M. NAUDET, *Bull. soc. chim. biol. (Trav.)*, 26 (1944) 1168.
- <sup>9</sup> R. O. FEUGE ET A. E. BAILEY, *Oil and Soap*, 23 (1946) 259.
- <sup>10</sup> P. DESNUELLE ET M. NAUDET, *Bull. soc. chim. (France)*, 12 (1945) 998.
- <sup>11</sup> P. DESNUELLE, M. NAUDET ET J. ROUZIER, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 1242.
- <sup>12</sup> G. S. JAMIESON, *Oil Fat In.*, 3 (1926) 307.
- <sup>13</sup> R. O. FEUGE, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 24 (1947) 49.
- <sup>14</sup> A. C. FRAZER, *Physiol. Revs.*, 26 (1946) 103.

Reçu le 21 juillet 1948